



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

KINETIKA TVORBY KYSELINY MLÉČNÉ V KEFIRU

KINETIC OF LACTIC ACID FORMATION IN KEFIR

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Zbyněk Fajtl

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Mária Veselá, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1093/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Zbyněk Fajtl**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **RNDr. Mária Veselá, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Kinetika tvorby kyseliny mléčné v kefiru

Zadání bakalářské práce:

1. Prostudujte relevantní literární zdroje a sestavte rešerši shrňující současný stav poznání o kefiru.
2. Prostudujte metody stanovení laktosy a kyseliny mléčné.
3. Na základě analýzy fermentovaného mléka, sestavte kinetické křivky sledovaných komponent.

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Zbyněk Fajtl
student(ka)

RNDr. Mária Veselá, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá kinetikou tvorby kyseliny mléčné a spotřebě laktózy při fermentaci kefiru, z jednoho druhu mléka za stejných podmínek. Teoretická část obsahuje informace na téma kefiru a kefirových zrn, laktózové intolerance, antimikrobiálních vlastnostech a vysokoúčinné kapalinové chromatografie. V experimentální části jsou popsány metody/postupy práce použité pro samotnou výrobu kefiru, stanovení kyseliny mléčné a laktózy. Vzorky kefiru byly v přesně daných časových intervalech testovány na množství laktózy, kyseliny mléčné a množství laktobacilů. Data byla graficky vyhodnocena a okomentována. Výsledky této práce mohou posloužit spotřebitelům s poruchou trávení laktózy a také spotřebitelům hledajících zdroj laktobacilů vhodných pro vylepšení střevní mikrobioty bez použití komerčně dostupných suplementů.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the kinetic production of lactic acid and consumption of lactose in the kefir fermentation from one type of milk under the same conditions. The theoretical part contains information on kefir and kefir grains, lactose intolerance, antimicrobial properties and high-performance liquid chromatography. The experimental part describes the methods and procedures used in the manufacture of kefir itself, the determination of lactic acid and lactose. Kefir samples were tested at precise time intervals for lactose, lactic acid and lactobacilli. The data was graphically evaluated and commented. The results of this work may be beneficial for consumers with lactose maldigestion and for consumers searching for qualite source of lactobacilli for enhancing their gut microflora.

KLÍČOVÁ SLOVA

laktóza, fermentace, HPLC, bakterie mléčného kvašení

KEY WORDS

lactose, fermentation, HPLC, lactic acid bacteria

CITACE

FAJTL, Z. Kinetika tvorby kyseliny mléčné v kefiru. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 34 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Mária Veselá, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem citoval správně a úplně. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

podpis studenta

Poděkování

Děkuji RNDr. Mária Veselá, Ph.D. za cenné rady, ochotu a laskavost při zpracování této bakalářské práce. Dále bych rád poděkoval Ing. Viliam Hlaváček za pomoc při přípravě vzorků a praktickým radám k mojí práci.

1	Úvod	7
2	Teoretická část	8
2.1	Charakterizace kefiru a kefirových zrn	8
2.2	Struktura kefirových zrn	8
2.2.1	Mikroflóra kefirových zrn	9
2.3	Zdroje mléka pro kefir	9
2.4	Bakterie mléčného kvašení	9
2.4.1	Současné taxonomické zařazení BMK	10
2.5	Porucha trávení laktózy	10
2.5.1	Testování poruchy trávení laktózy	10
2.5.2	Rozdíl mezi intolerancí na laktózu a pouhou poruchou trávení laktózy	10
2.6	Antimikrobiální efekt kefiru	11
2.7	O fermentaci	11
2.8	Fermentace bakteriemi mléčného kvašení	11
2.8.1	Fermentace disacharidů	12
2.8.2	Kyselina mléčná	12
2.9	Úvod chromatografie	13
2.9.1	Kapalinová chromatografie	14
2.10	HPLC	14
2.10.1	Stacionární fáze	14
2.10.2	Detektor	15
2.10.2.1	UV-VIS detektor	15
2.10.2.2	RI detektor	15
2.11	Nepřímé stanovení počtu buněk MO kultivační metodou	15
2.11.1	Ředění bakteriální kultury	15
2.11.2	Očkování přelivem	16
2.11.3	Vypočet	16
3	Experimentální část	17
3.1	Pomůcky	17
3.2	Chemikálie	17
3.3	Použitá kefirová zrna	17
3.4	Skladování kefirových zrn	18
3.5	Mléko pro výrobu kefiru	18
3.6	Výroba kefiru	18
3.7	Příprava vzorku pro HPLC (deproteinace + ředění)	18
3.8	Parametry HPLC	18
3.9	Postup práce na HPLC	19

3.10	Nepřímé stanovení počtu buněk MO kultivační metodou	19
3.10.1	Příprava vzorku	19
3.10.2	Příprava kultivačního média pro laktobacily	19
3.10.3	Počítání vyrostlých kolonií a stanovení počtu buněk	19
4	Výsledky a diskuze	20
4.1	Měření pH a kyseliny mléčné na počátku fermentace	20
4.2	Stanovení množství laktobacilů ve 24 hodin fermentovaném keфіru	24
5	Závěr:	26
6	Zdroje	27
7	Seznam zkratek	29
8	Seznam obrázků	30
9	Seznam tabulek	30
10	Přílohy	31

1 ÚVOD

Uchovávání jídla fermentací je už od antických dob ve všech kulturách široce využívaná technologie. Tehdy lidé samozřejmě netušili, že změna potravin nastává vlivem mikroorganismů, to jim ale nezabránilo naplno využívat výhody, které fermentace přináší.

Fermentace zaručuje nejenom prodloužení doby trvanlivosti a zajištění pro spotřebitele bezpečnou potravinu po stránce mikrobiální, dokáže i udělat některá jídla více stravitelná a organolepticky přijatelnější. První záznamy popisující metody pro fermentaci mléka, masa i zeleniny začali vznikat 6000 let před našim letopočtem.

Zkvašením mléka pomocí keřirových zrn vzniká kyselý nápoj nazývaný keřir. Ten se připravuje nejčastěji z kravského mléka za pomoci keřirových zrn, což jsou želatinové útvary podobné kvěťáku, které obsahují bakterie (nejčastěji laktobacily) a kvasinky, spolu žijící v symbióze. Tradiční způsob fermentace pomocí keřirových zrn se neuplatňuje v technologickém provozu, zde se využívá pro zaočkování inokulem z předchozí várky.

Cílem této práce bylo stanovit kinetické parametry v průběhu fermentace mléka (jako je obsah laktózy a kyseliny mléčné), tyto informace jsou vysoce užitečné pro všechny spotřebitele, kteří by rádi konzumovali mléčné výrobky, ale trpí poruchou trávení laktózy.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Charakterizace kefiru a kefirových zrn

Kefír je nakyslé fermentované mléko, s nízkým obsahem alkoholu. Získává se inkubací kefirových zrn v mléce. Kefirová zrna (viz. Obrázek 1) jsou velmi unikátní symbiotický systém různých mikroorganismů. Zejména tedy bakterií mléčného kvašení, kvasinek a občas i octových bakterií. Tyto zrna jsou želatinové nepravidelné útvary, bílé nebo žluté barvy. Jejich matrice je složená z proteinů a polysacharidů. Rozměr kefirových zrn je proměnlivý, mohou dosahovat až 3 cm v průměru. Tvar kefirových zrn je podobný „pop-kornu“ či kvěťáku. V průběhu fermentace dochází k tvorbě biomasy a zrna nabývají na váze. Zrna jsou obvykle po fermentaci vytažena z kefiru, aby mohla být znova použita [1], [2].

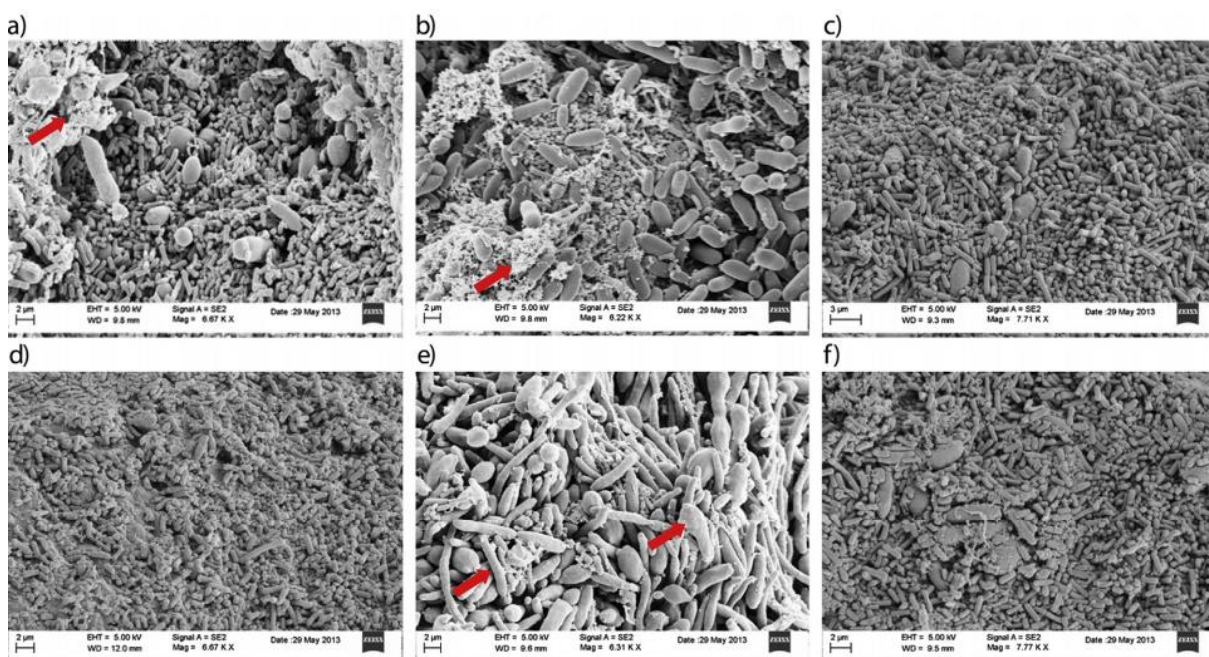


Obrázek 1: Kefirové zrno [3]

Kefirová zrna pocházející z Ruska, bývalé Jugoslávie, Bulharska či Švédska obsahují přibližně 90 % vody, 3,2 % proteinů, 0,3 % lipidů, 0,7 % popele a 5,8 % nedusíkatých rozpustných látek. Naproti tomu kefirová zrna z Argentiny obsahují 83 % vody, 9–10 % polysacharidů a 4,5 % proteinů. Tyto údaje nejsou absolutní, biodiverzita se může lišit velmi významně i v oblasti stejného regionu, jelikož vlastnosti mikrobiální kompozice závisí na mnoha faktorech [1], [2].

2.2 Struktura kefirových zrn

Pozorování kefirových zrn pod rastrovacím elektronovým mikroskopem (Obrázek 2) ukázalo, že kefirová zrna mají velmi drsný povrch, a že vnitřní části měli po sobě rozmístěné nepravidelné otvory, připomínající kolekci malých kráterů. Toto stejné pozorování bylo už uskutečněno v jiném výzkumu, kdy se pozorující domnívali, že jde výsledek procedury, pro pozorování kefiru elektronovým mikroskopem. Avšak když kefir pozorovali okem, vnější povrch byl hladký a lesklý. Interiér kefirových zrn obsahuje nestrukturovaný materiál. Tento fibrilární materiál byl interpretován jako směs proteinů, lipidů a rozpustného polysacharidu. Kefiranový komplex, který obklopuje kvasinky a bakterie v kefirovém znu ukázal, že matrix kefirových zrn je složena z 13 % proteinu, 24 % polysacharidu spolu s buněčným odpadem a neznámými komponenty. Bylo pozorováno, že kvasinky se více nalézají na svrchních částech kefirových zrn než bakterie, to proto že bakterie jsou příliš vázané na fibrilární materiál (kefiran) vnitřní části kefirového zrna. Má se za to, že kvasinky jsou aerobní mikroorganismy, a proto mnohem raději kolonizují povrch kefirových zrn než jeho vnitřek [4].



Obrázek 2: snímky povrchu keřirových zrn z Itálie ze 6 různých regionů [1]

Bylo pozorováno mnoho druhů laktobacilů (krátké, dlouhé, zakřivené), ale nebyly zpozorovány žádné laktokoky (*Lactococci*) [4].

2.2.1 Mikroflóra keřirových zrn

Typická mikroflóra keřirových zrn se sestává z mléčných kvasinek, mléčných streptokoků-laktokoků a laktobacilů typických pro keřirová zrna. Z laktokoků jde převážně o *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *Cremoris*. Z laktobacilů jde především o *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus keřir*. Z mléčných kvasinek (fermentují laktózu s minimální tvorbou etanolu) se jedná o *Kluyveromyces fragilis*, *Torulopsis keřir* a další. Údaje o složení původní mikroflóry se v různých publikacích liší. Kromě těchto typických mikroorganismů, můžou keřirová zrna obsahovat i kontaminace dalších streptokoků, leukonostoků či octových bakterií [5].

2.3 Zdroje mléka pro keřir

Keřir může být vyroben nejen z druhů mléka, jako je kravské, koří či ovčí. Ale také ze zdrojů jako je sójové, rýřové a kokosové mléko. Volba mléka má velký vliv na výsledné složení keřiru, tak i na jeho senzorické vlastnosti [6].

2.4 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (dále jen BMK) jsou všeobecně považovány za mikroorganismy poskytující mnoho benefitů, některé druhy jsou dokonce považovány za zdraví prospěšné (probiotické) bakterie. Nicméně některé rody, jakými jsou *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* a *Carnobacterium* obsahují druhy/kmeny, které jsou prokazatelně patogenními pro lidi i zvířata. Z tohoto důvodu je nutné znát přesné taxonomické zařazení, metabolismus a molekulární biologii BMK, aby se využilo jejich pozitivních vlivů na zdraví, přičemž by se zamezilo potencionálním nebezpečím způsobených patogeny. BMK jsou tradičně asociována se vsádkovou tak i kontinuální fermentací [7].

2.4.1 Současné taxonomické zařazení BMK

BMK tvoří skupinu gram-pozitivních bakterií se společnými morfologickými, metabolickými a fyziologickými charakteristikami. Jsou to nesporeující, anaerobní avšak, dobře tolerují aerobní podmínky koky a tyčinky, které produkují kyselinu mléčnou jakožto jeden z hlavních produktů fermentace sacharidů [7].

Předchůdci BMK byli podle všeho mikroorganismy podobné rodu *Bacillus* pocházejících ze zemin, které ztratily část genů a s tím i asociované fyziologické funkce, přičemž se adaptovali na vysoce nutričně výživná prostředí [7].

2.5 Porucha trávení laktózy

Porucha trávení laktózy, je neschopnost kompletně strávit laktózu, disacharid, který se prakticky nachází ve všech savčích mlékách. Porucha trávení laktózy se vyskytuje přibližně u 75 % dospělé populace, nejčastěji se vyskytuje jako výsledek geneticky naprogramované snížení aktivity tenkého střeva trávit laktózu [8].

Mnoho lidí, kteří na sobě cítí, že jsou intolerantní na laktózu obvykle mají pouhou poruchu trávení laktózy. Nicméně téměř všichni jednotlivci, kteří mají do jisté míry nesnášenlivost na laktózu, přestože mnozí z nich nebyli diagnostikováni lékařem, mají tendenci se vyhýbat mléčným výrobkům. Vyhýbání se mléčným výrobkům obvykle vede k nedostatečnému přísunu všech živin, který má neblahý sklon ve výsledném zdravotním stavu jednotlivce, jako je například na minerály chudá kostní tkáň. Má se za to, že mléčné výrobky jsou klíčový základ potravy, avšak výzkum vlivu intolerance laktózy na zdraví kostí vyprodukoval protichůdné výsledky [9].

2.5.1 Testování poruchy trávení laktózy

Dnes nejběžnějším testem pro stanovení, zda má člověk poruchu trávení laktózy je dechový vodíkový test. Ten funguje na principu uvolňování plynného vodíku, tvořícího se fermentačními bakteriemi v tlustém střevě poté, co došlo k průchodu sacharidu tenkým střevem. Část tohoto plynu se naváže do krve a poté z těla odejde skrze plíce [8].



Obrázek 3: Ruční dechový tester pro monitorování vodíku [10]

2.5.2 Rozdíl mezi intolerancí na laktózu a pouhou poruchou trávení laktózy

Intolerance na laktózu se liší od poruchy trávení laktózy tím, že u postižených osob se po požití laktózy vyskytují symptomy, jako jsou bolesti břicha, plynatost, nadýmání, nevolnost, průjem, které byly způsobeny požitím laktózy [8].

2.6 Antimikrobiální efekt kefiru

Kefír jakožto celek, má mnohem vyšší antimikrobiální aktivitu než jeho jednotlivé komponenty. Kromě toho, kefir vykazuje dobrou účinnost při inhibici tvorby spor a alfatoxinu B1 produkovaný *Aspergillus flavus*. Z tohoto důvodu je kefir nejen dobrým zdroje probiotik, ale taktéž má potenciál jako bezpečný konzervant, poskytující ochranu proti intoxikaci alfatoxinem B1 [4].

Mycobacterium bovis, která způsobuje bovinní tuberkulózy (BTB), může být přenášena na člověka skrz konzumaci syrového mléka, nebo syrových fermentovaných mléčných produktů z nakažených zvířat. Avšak bakterie mléčného kvašení používané v tradičních afrických mléčných výrobcích produkují antimikrobiální látky, které inhibují některé patogenní a znehodnocující bakterie *M. bovis* [11].

2.7 O fermentaci

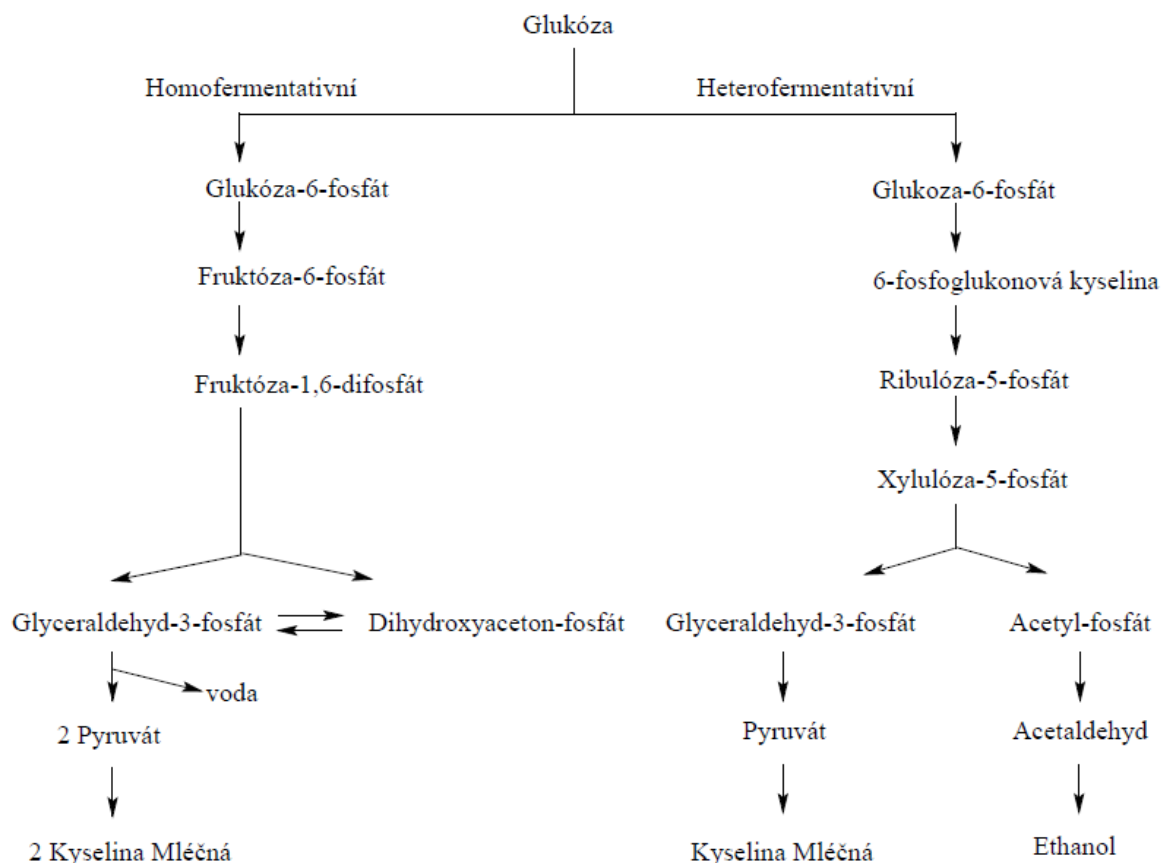
Výroba fermentovaných potravin byla v minulosti založená na spontánní fermentaci původní (autochtonní) mikroflórou nacházejících se v surovině. Tento způsob byl vylepšen nejprve přidáváním části fermentované potraviny z předcházející fermentace, což je charakteristické pro výrobu chleba a některých sýrů. V současnosti se průmyslová výroba neobejde bez speciálních předem připravených mikrobiálních kultur. Díky tomu je možné zamezit kontaminacím ke kterým dochází při zaočkování již zfermentovanou surovinou [12].

2.8 Fermentace bakteriemi mléčného kvašení

Protože BMK nevlastní funkční respirační systém, musí energii získat energií z fosforylace na úrovni substrátu. Pro hexózy existují dvě základní fermentační cesty. **Homofermentativní** cesta je založena na glykolýze (Embden-Meyerhof-Parnasova cesta) jejím produktem je prakticky pouze kyselina mléčná [7].

Heterofermentativní cesta nebo heterolaktátová fermentace (taktéž známá jako: pentózová fosfoketolázová cesta) produkuje mimo jiné ke kyselině mléčné i značné množství oxidu uhličitého a ethanolu, nebo acetátu. Homolaktická fermentace produkuje 2 moly ATP na 1 mol glukózy. Heterofermentativní fermentace produkuje z 1 molu glukózy 0,5 mol kyseliny mléčné, 1 mol ATP a 1 mol CO₂ [7].

Pentózy mohou být fermentovány heterofermentativně pouze pokud vstupují do dráhy jako ribulóza-5-fosfát, nebo xylulóza-5-fosfát, v tomto případě avšak nevzniká žádný oxid uhličitý [7].



Obrázek 4: Zjednodušené schéma homofermentativní a heterofermentativní dráhy [13]

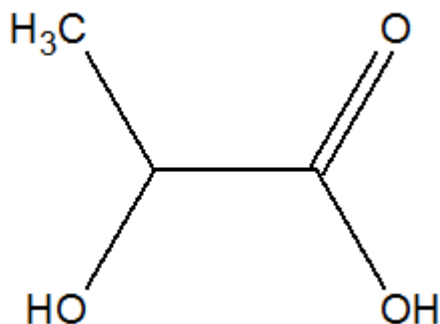
2.8.1 Fermentace disacharidů

Z důvodu obsahu laktózy v mléce, jakožto historicky významné komoditě, byl metabolismus tohoto disacharidu již mnohokrát studován. Laktóza může vstoupit do buňky buď účinkem specifické permeázy, nebo jako fosfát laktózy skrz fosfotransferázový systém. Oba tyto systémy mohou v některých případech fungovat zároveň. Pokud je transport zprostředkován permeázou, dojde u laktózy k rozpůlení na glukózu a galaktózu enzymem β -D-galaktosidázou, následně mohou být oba monosacharidy každý zvlášť vstoupit do hlavních fermentačních cest. V případě fosfotransferázového systému je potřeba enzymu fosfo- β -D-galaktosidázy, pro rozštěpení fosfátu laktózy na glukózu a galaktózu-6-fosfát [7].

2.8.2 Kyselina mléčná

Kyselina mléčná je alifatická hydroxykyselina (Obrázek 5). V masě a ve vnitřnostech je přítomná jako (S)-2-hydroxypropanová kyselina, která zde vzniká anaerobní glykolýzou z glykogenu. V čerstvém hovězím masě bývá přítomna v množství 0,2–0,8 % [14].

Homofermentativní bakterie mléčného kvašení produkují (S)-kyselinu mléčnou. Při heterofermentativním mléčném kvašení (většina bakterií) se produkují oba dva izomery kyseliny mléčné. Obsah kyseliny mléčné v mléčných výrobcích je v rozsahu 0,5–1 %. Z tohoto množství je v jogurtech asi 54 % L-mléčné kyseliny, 76 % v případě sýru typu Ementál a 96 % v kysané smetaně [14].



Obrázek 5: 2–hydroxypropanová kyselina (k. mléčná)

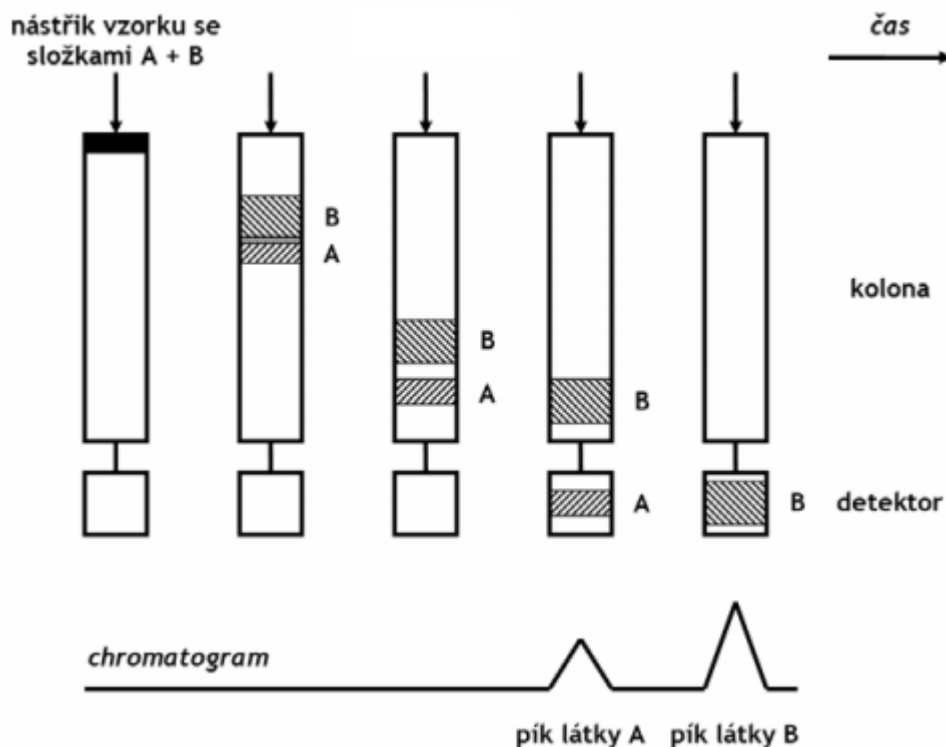
2.9 Úvod chromatografie

Chromatografie je primární separační metoda, využívá se u ní mnohokrát opakovaného ustanovení rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými fázemi. Jedná se o velmi univerzální techniku, lze díky ní v jednom kroku separovat směs na individuální složky a současně získat kvalitativní i kvantitativní informace, to znamená kromě určení složení směsi lze stanovit i koncentraci jednotlivých složek [15], [16].

Podstatou chromatického procesu je distribuce složek směsi mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je označována jako mobilní a druhá stacionární. Jako mobilní fáze se využívá plyn anebo kapalina, stacionární fáze má podle typu chromatografie rozdílnou formu, například částice, tuhá fáze, tenká vrstva kapaliny na pevných částicích a další. Během chromatického dělení dochází k opakovanému transportu složek do stacionární fáze a zpět do fáze mobilní. Přitom se chromatografický systém přibliží rovnováze, že rozdělení složky mezi dvě fáze lze popsat distribuční (rozdělovací) konstantou (koeficientem) vyjadřujícím poměr rovnovážných koncentrací složky v obou fázích [15].

Chromatografie je nejsilnější nástroj v rukou analytického chemika pro separaci a následné měření látek v komplexních směších. V propojení například s hmotnostním spektrometrem a infračervenou spektroskopií, chromatografie může identifikovat jednotlivé složky velmi dobře [16].

Chromatografie je proces, kterým se separují sloučeniny jedna od druhé, tím že projdou skrz kolonu, která některé složky v sobě drží jinak déle než druhé. Na Obrázek 6 je kolona naplněná stacionární fází a vyplněná rozpouštědlem, do ní svrchu přichází roztok se sloučeninami A a B, po otevření ventilu začnou být A a B unášeny mobilní fází a prochází kolonou, protože na obrázku je více adsorbovaná složka B na stacionární fázi než složka A, zůstává tedy složka B po kratší dobu ve fázi mobilní a kolonu opustí až po složce A. Mobilní fázi u kapalinové chromatografie je kapalina a u plynové chromatografie je mobilní fázi plyn [16].



Obrázek 6: Zjednodušené schéma kapalinové chromatografie [15]

2.9.1 Kapalinová chromatografie

Podle druhu stacionární fáze se chromatografie dělí na chromatografii na tenké vrstvě (thin layer chromatography – LC), papírovou chromatografii (paper chromatography – PC) a na kapalinovou kolonovou chromatografii (liquid column chromatography – LC) [16].

2.10 HPLC

Vysoko-účinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography – HPLC) využívá vysoký tlak, aby donutila projít eluent skrz zavřenou kolonu naplněnou částicemi o velikosti micronů, což poskytuje výtečnou separaci. Esenciální části jsou pumpa (solvent delivery system), ventil pro nástřik vzorku (sample injection valve), detektor a počítač pro vyhodnocení [16].

2.10.1 Stacionární fáze

Normal-phase chromatography využívá polární stacionární fáze a méně polárního rozpouštědla/solventu. Eluční síla se zvyšuje přidáváním více polárního solventu. Reverse-phase chromatography je více časté schéma, ve kterém je stacionární fáze nepolární, nebo lehce polární a solvent je více polární. Eluční síla se zvyšuje přidáním méně polárního rozpouštědla. Reverse-phase chromatografie eliminuje tzv. tailing, který vzniká kvůli adsorpci polární složky na polární stacionární fázi [16].

2.10.2 Detektor

2.10.2.1 UV-VIS detektor

UV-VIS detektor je nejvíce využívaný detektor pro HPLC. Je lehký k používání, citlivý, selektivní a těžko opotřebitelný. Když světlo projde skrz kapalinu (mobilní fáze), intenzita adsorpce je proporcionální koncentraci analytu v mobilní fázi (C) a optická délce dráhy (L). (Lambert–Beer law) [17].

$$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon \cdot L \cdot C$$

Obrázek 7: Lambert-Beerův zákon

kde I_0 je intenzita světelného paprsku procházející detektorovým článkem beze vzorku, I je intenzita světelného paprsku procházející detektorovým článkem se vzorkem. Analyt lze monitorovat pouze pokud obsahuje chromofor, jinak je UV-VIS detekce nemožná. Pokud není chromofor přítomný, je možné předem vzorek derivatizovat. U moderních UV-VIS spektrofotometru je výhodou možnost měřit naráz při více vlnových délkách. Čímž je možno od sebe odlišit mnoho analytů které se liší různými absorpčními maximy [17].

Určení kyseliny mléčné lze provést na základě redoxní reakce mezi kyselinou mléčnou a železem ve formě Fe(III) , které se redukuje na Fe(II) při UV záření, tato směs se poté nechá reagovat s o-fenantrolinem. Komplex vzniklý reakcí Fe(II) a o-fenantrolinu. Je barevný a je možné ho spektrofotometricky stanovovat při 512 nm. Metoda má lineární rozsah mezi $0,5\text{--}50 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ s limitem detekce $0,16 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ [18].

2.10.2.2 RI detektor

Refraktometrický detektor je založen na měření indexu lomu. Citlivost metody je závislá na rozdílu indexu lomu analytu a mobilní fáze. Metoda je proto univerzální, ale je závislá hodně na teplotě, proto musí být kolona konstantně vytemperovaná. Měření je diferenční, tj. paprsek prochází měřenou a srovnávací celou, měří se rozdíl intenzity světla, které dopadá na detektor [19].

2.11 Nepřímé stanovení počtu buněk MO kultivační metodou

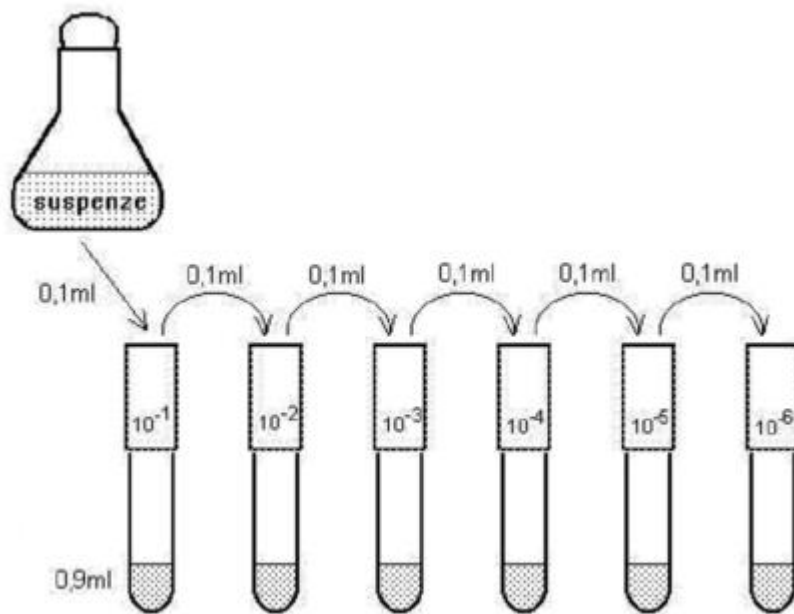
Pro potřeby výzkumu se používá stanovení počtu buněk k posouzení kinetiky růstu a ke stanovení specifické rychlosti růstu, pro různé fáze jejich vývoje. Kultivační stanovení počtu buněk se používá pro kontrolu potravin v laboratořích potravinářského průmyslu, při mikrobiologických rozborech potravinářských surovin i hotových výrobků. Nejčastějším způsobem počítání buněk mikroorganismů pomocí kultivace je počítání viditelných makroskopických kolonií vyrostlých na agarových plotnách. Metoda vychází z předpokladu, že z jedné životaschopné buňky vyroste jedna kolonie. Jednotlivé kolonie jsou spočítány a přepočteny na 1 ml původního vzorku [20].

Na stanovení počtu mikroorganismu (laktobacilů) nepřímou kultivační metodou je zapotřebí selektivní živné půdy – MRS živnému médiu. Principem analýzy je, že se živná půda vpraví do Petriho misek, které se zaočkují inokulem izolovaného ze vzorku a takto připravené Petriho misky se nechají kultivovat po určitý čas a při určité konstantní teplotě v termostatu. Zaočkování inokula do agarového média se pro stanovení laktobacilů dělá přelítím potřebného objemu inokula (nejčastěji 1 ml) vytemperovaným agarem na cca 45°C [20].

2.11.1 Ředění bakteriální kultury

K tomu, aby bylo dosaženo nárůstu jednotlivých kolonií, se musí suspenze bakterií ředit. Pro tento postup se zvolí určitý koeficient zředění, který poskytne geometrickou řadu.

Nejčastějším koeficientem je číslo 10. Jako ředidlo se využívá sterilní fyziologický roztok. Nejprve se připraví řada zkumavek s 9 ml fyziologického roztoku. Ze vzorku kefiru se odebere pipetou 1 ml suspenze do 1. zkumavky. Zkumavka se zvortexuje a pokračuje s ve ředění, dokud se nezískalo ředění 10^{-5} a 10^{-6} . Tyto konečná ředění byla zvolena z důvodu, že při těchto koncentracích narostlo na Petriho misce o průměru 10 cm 20–200 kolonií. Celý postup je prováděn asepticky, to znamená že na každé pipetování ředěného vzorku se uskutečňovalo za sterilních pomůcek. Z praktických důvodů se odebíralo 10 ml kefiru do 90 ml fyziologického roztoku pro získání koncentrace 10^{-1} [20].



Obrázek 8: Schéma desítkového ředění [20]

2.11.2 Očkování přelivem

Očkuje se do sterilních Petriho misek 1 ml zkoumaného vzorku. Každá miska se pak přelije vytemperovaným živným médiem. Po ztuhnutí bylo je zalita ještě jednou vrstvou agarového média, pro získání anaerobních podmínek. Po ztuhnutí se Petriho misky ukládají dnem vzhůru v termostatu temperovaném na 37 °C [20].

Pro kontrolu se vždy očkují 2 Petriho misky stejným ředěním. Laktobacily se ponechávají kultivovat 2 dny při teplotě 37 °C [20].

2.11.3 Vypočet

Počet buněk MO v 1 ml kultury (x):

$$x = MO \cdot z \cdot X$$

MO průměrný počet kolonií ze dvou paralelních Petriho misek

z použité zředění

X přepočet na 1 ml (podle pipetovaného objemu)

Výsledný počet buněk MO se vyjadřuje jako KTJ, tj. kolonie tvořící jednotku (angl. CFU, colony forming unit), neboť 1 kolonie ne vždy reprezentuje 1 buňku. Kolonie může vzniknout ze skupiny stejných buněk, které jsou spolu dočasně spojeny [20].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Pomůcky

- sterilní laboratorní sklo – plastové Petriho misky, zkumavky, Erlenmeyerovy baňky, odměrný válec, pipety, mikropipety
- váhy
- stojan na zkumavky
- třepačka
- vortex
- autokláv
- HPLC
- centrifuga
- lednice

3.2 Chemikálie

- vzorek kefiru
- fyziologický roztok (8,5 g NaCl na 1000 ml destilované vody)
- Carrezovo činidlo I a II (roztoky síranu zinečnatého a hexakyanoželeznatého draselného)
- lactobacillus MRS broth HI media, Čaderský-Envitek s.r.o.
- agar

3.3 Použitá kefirová zrna

Kefirová zrna použitá pro měření byla získána z české domácnosti.



Obrázek 9: Kefirová zrna použitá pro měření (40 g, maximálně 0,5 cm průměr zrn)

3.4 Skladování keřirových zrn

Zrna byla skladována ve 100 ml uzavíratelných nádobách s plastovým uzávěrem v lednici při 4 °C. Pro zamezení přístupu vzduchu byla zalita mlékem. Vždy po dobu maximálně týdne od posledního využití (při výrobě keřiru za laboratorní teploty).

3.5 Mléko pro výrobu keřiru

Bylo použito čerstvé plnotučné mléko, ošetřené vysokou pasterací značky mlékárna Kunín s obsahem tuku minimálně 3,5 %. Mléko bylo zakoupeno v obchodním řetězci Tesco.

3.6 Výroba keřiru

Bylo naváženo sterilní nerezovou lžičkou vždy okolo 40 g přecezené keřirové kultury, rovnou do vysterilizované 1000ml kuželové baňky dle Erlenmeyera. Baňka byla naplněna 1 l mléka vytemperovaného na laboratorní teplotu. Hrdlo baňky bylo překryto. Takto připravená baňka dle Erlenmeyera, byla postavena do třepačky po dobu 24 h. Stupeň rychlosti byl nastaven na 2. Tento stupeň rychlosti představuje okolo 100 otáček za minutu, což byla rychlost, při které keřirová zrna byla dobře rozptyle v mléce a zároveň nedocházelo k ulpívání zrn na dně baňky.

3.7 Příprava vzorku pro HPLC (deproteinace + ředění)

1 ml keřiru byl napipetován do mikro zkumavky typu Eppendorf. Bylo přidáno Carrezovo činidlo I a II v poměru 1:100. Eppendorfovy zkumavky byly umístěny do centrifugy na 13 000 g po dobu 10 minut, při teplotě 5 °C. Supernatant byl slit přes stříkačku opatřenou mikrofiltrem pro získání vyčištěného supernatantu, vhodného pro následné ředění a měření.

3.8 Parametry HPLC

Tabulka 1: HPLC parametry

typ kolony	Rezex – Phenomenex (ROA – organic acid OOH-0138-KO)
zrnitost	8 mm
částice	z křemíku potažené 18 uhlíkovými řetězci
modifikace (částic)	sulfonovaný styren divinylbenzen
temperováno na	60 °C
pumpa – tlak	55 bar
pumpa – objemový průtok	1,000 ml·min ⁻¹
mobilní fáze	5mM kyselina sírová
detekce	refraktometrický detektor pro sacharidy UV detekce při 208 nm pro organické kyseliny (k. mléčná)

3.9 Postup práce na HPLC

20 µl vhodně naředěného předpřipraveného vzorku byl stříkačkou typu Hamilton vpraven do nástřikové kolony. Následně otočením kohoutu se spustilo měření a vzorek začal být unášen eluentem do kolony. Samotné měření bylo nastaveno na 15 minut od nástřiku do kolony.

3.10 Nepřímé stanovení počtu buněk MO kultivační metodou

3.10.1 Příprava vzorku

Bylo napipetováno 10 ml kefiru širokohrdlou pipetou rovnou do 100ml Erlemayerovi baňky s 90 ml fyziologického roztoku. Připravená suspenze se zamíchala a byla použita pro přípravu dalších ředění.

3.10.2 Příprava kultivačního média pro laktobacily

Do Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 11,02 g MRS, 4 g agaru a zalito 200 ml destilované vody. MRS agarová půda byla sterilizována v autoklávu 20 min při 118 °C.

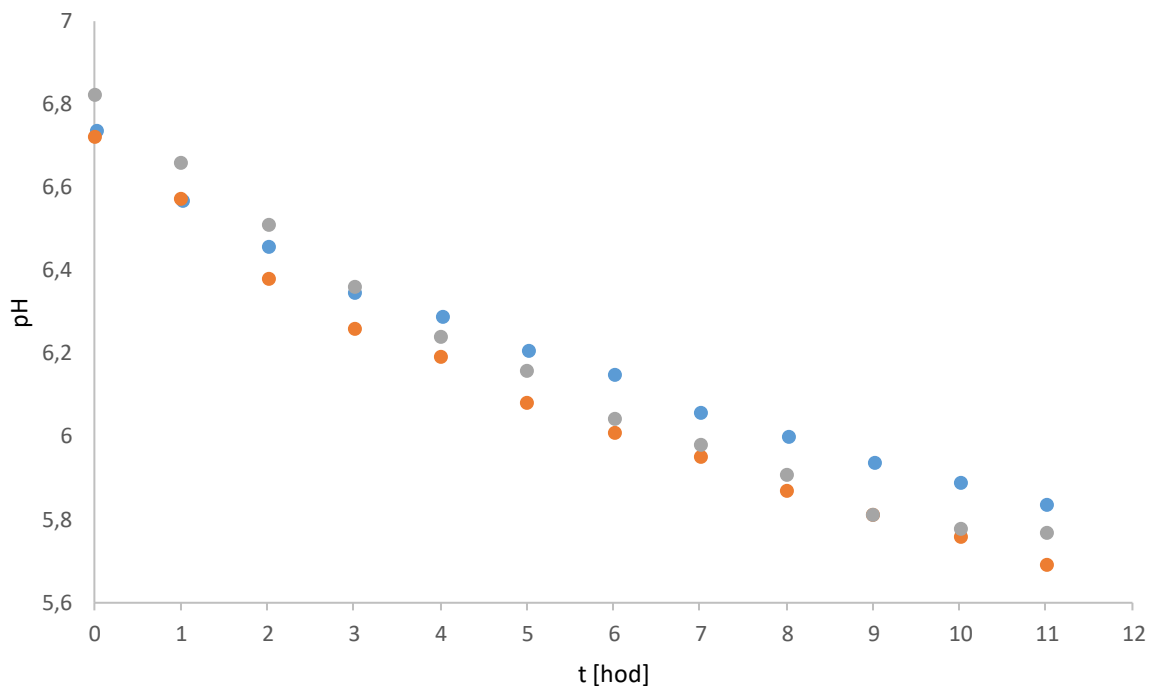
3.10.3 Počítání vyrostlých kolonií a stanovení počtu buněk

Pro hodnocení vyrostlých kolonií byla vybrána nejvhodnější ředění, na kterých vyrostlo 20–200 kolonií. Pro lepší orientaci, které kolonie byly započítány se sklo Petriho misky označovalo fixem.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

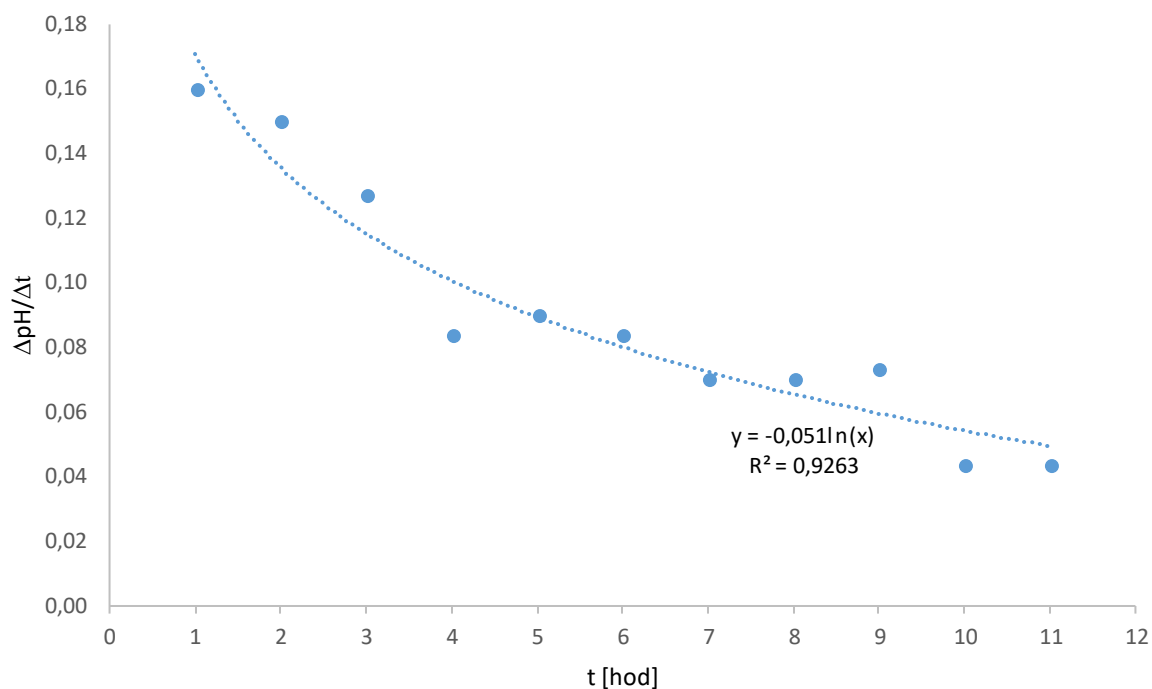
Hlavní náplní této práce bylo studovat vznik kyseliny mléčné a úbytek laktózy v kefiru po určitých časových intervalech, taktéž i tomu odpovídající změnu pH. Dále bylo zjišťováno množství laktobacilů ve 24 h kultivovaném kefiru.

4.1 Měření pH a kyseliny mléčné na počátku fermentace



Obrázek 10: Změny pH v průběhu fermentace

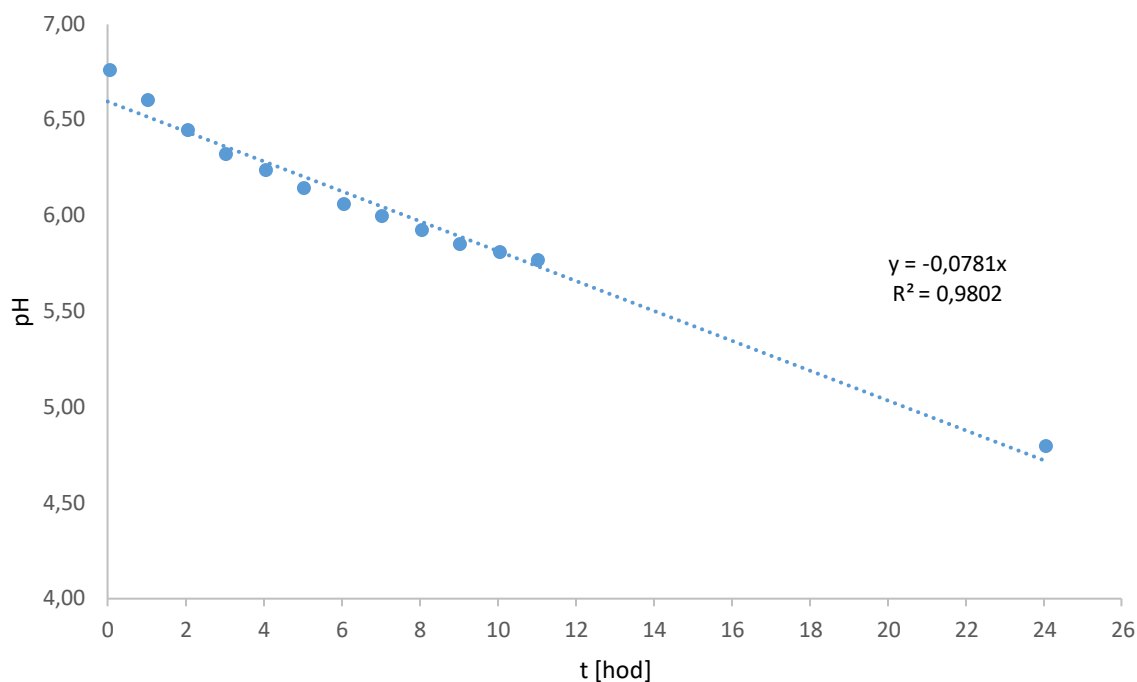
Z grafu lze pozorovat že pH klesá nejrychleji v prvních hodinách fermentace, tento úkaz lze ještě lépe vidět ve grafu pro $\Delta\text{pH}/\Delta t$ v závislosti na čase.



Obrázek 11: $\Delta pH/\Delta t$ v závislosti čase

Pro vyhodnocení byla použita průměrná hodnota změny pH pro lepší orientaci v grafu. Z grafu lze vidět, že pH skutečně nejrychleji klesalo v prvních hodinách fermentace a postupně se rychlost snižovala. Pro naměřené hodnoty nejvíce odpovídá (dle směrodatné odchylky) logaritmická funkce.

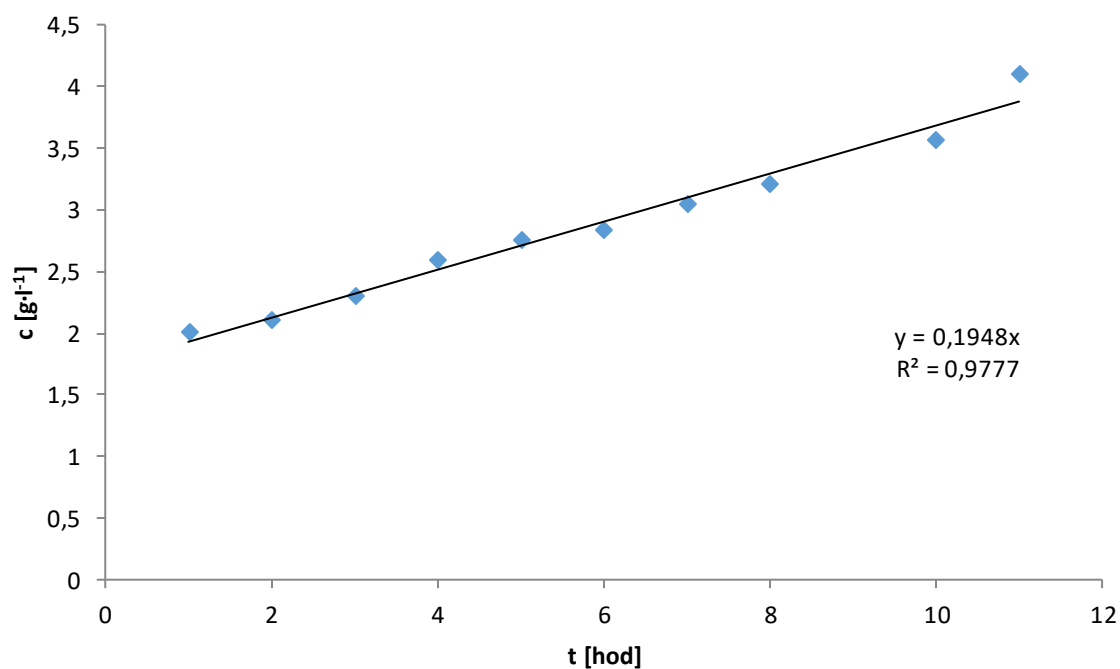
Na následujícím grafu jde vidět průměrná hodnota pH v závislosti na čase, graf je obohacen o průměrnou hodnotu pH po 24 hodinách kultivace, tato hodnota je získána ze pěti paralelních měření kefiru po 24 h. (kefir byl fermentován za stejných podmínek)



Obrázek 12: Změny pH v průběhu fermentace

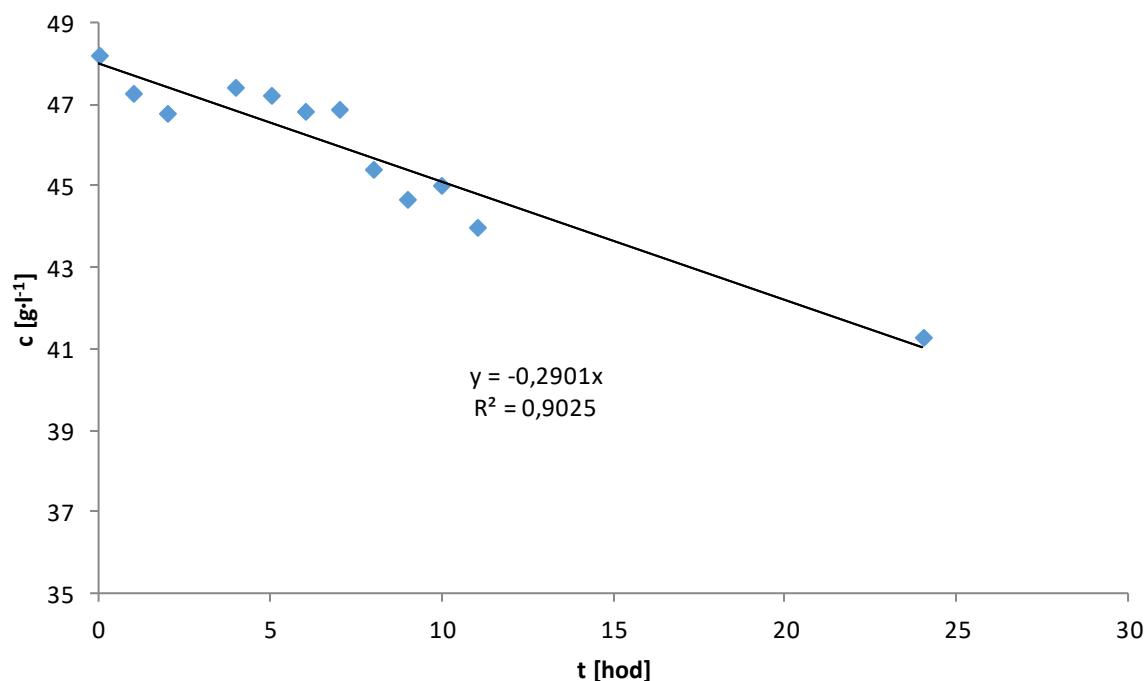
Lze pozorovat, že pH klesá přímo úměrně, přestože při fermentaci po prvních hodinách došlo ke zpomalení poklesu pH, je možné že po 11 h začnou být více aktivní kvasinky. Da se však předpokládat, že rychlost snižujícího se pH kefíru bude s postupem času ještě více klesat, až do bodu, kdy se pH bude měnit velmi pomalu až bude téměř konstantní.

Tvorba kyseliny mléčné měla lineární odezvu. Samotné mléko obsahovalo zanedbatelné množství kyseliny mléčné, již po první hodině lze ale pozorovat přes 2 gramy na litr. Tento skok je způsoben obsahem k. mléčné v inokulu – kefirových zrnech.



Obrázek 13: Tvorba kyseliny mléčné v průběhu fermentace

Při stanovování laktózy docházelo k nepřesnostem, u naměřených dat lze pozorovat lineární pokles laktózy. Reprezentativní chromatogramy mléka a kefiru po 24 h jsou uvedeny v Přílohy. Pro stanovení laktózy bylo využito RI detektoru a pro kyselinu mléčnou se využíval UV-VIS spektrofotometr.



Obrázek 14: Množství laktózy v průběhu fermentace

4.2 Stanovení množství laktobacilů ve 24 hodin fermentovaném kefíru

Tabulka 2: Kultivace laktobacilů na MRS médiu

č. měření	pH Kefíru	počet kolonií 10^{-5} [KTJ·ml ⁻¹]	počet kolonií 10^{-6} [KTJ·ml ⁻¹]
1	5,02	-	98,5
2	4,8	68,5	-
3	4,98	162,5	18,5

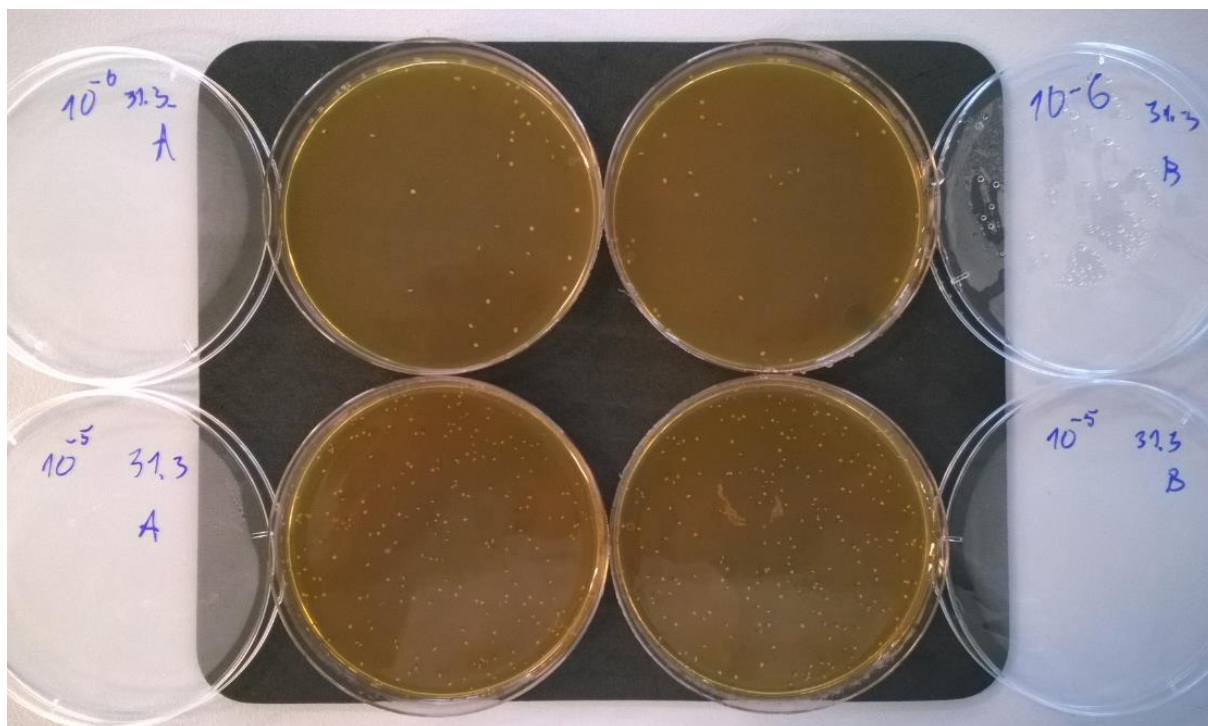
Příklad výpočtu pro měření 1:

$$x = MO \cdot z \cdot X$$

$$x = \frac{95 + 102}{2} \cdot 10^6 \cdot 1 = 9,85 \cdot 10^7 \text{ KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$$

Tabulka 3: Naměřená data 24 h kultivovaného kefíru

č. měření	pH Kefíru	x [KTJ·ml ⁻¹]	c _{k. mléčná} [g·l ⁻¹]	c _{laktóza} [g·l ⁻¹]
1	5,02	$9,85 \cdot 10^7$	5,73	44,93
2	4,80	$6,85 \cdot 10^6$	8,32	41,40
3	4,98	$1,63 \cdot 10^7$	7,22	37,51
průměr	4,93	$4,06 \cdot 10^7$	7,09	41,28



Obrázek 15: Kultivace laktobacilů na MRS médiu

Tabulka 4: Srovnání aerobních a anaerobních podmínek

	pH Keřiru	$c_{\text{k. mléčná}} [\text{g} \cdot \text{l}^{-1}]$	$c_{\text{laktóza}} [\text{g} \cdot \text{l}^{-1}]$
průměr aerobních pokusů	4,93	7,09	41,28
striktně anaerobní pokus	4,73	8,83	37,53

Při využití striktně anaerobních podmínek došlo při fermentaci k rychlejšímu průběhu, což se projevilo vyšším množstvím vzniklé kyseliny mléčné a spotřebované laktózy.

5 ZÁVĚR:

Cílem této bakalářské práce bylo sledovat obsah kyseliny mléčné a laktózy při fermentaci kefiru a následně sestavit kinetické křivky. Taktéž byly i stanovovány laktobacily nepřímým stanovením.

Laktóza klesala přímou úměrou při prvních 11 hodinách měření, dle grafu lze usuzovat, že pokles pokračoval přímou úměrou do 24 hodin. Další data nebyla měřená, dá se však očekávat, že se rychlost nadále zpomalí. Na druhé straně kyselina mléčná stoupala přímou úměrou při prvních 11 hodinách měření a pak dále pokračovala růst přímou úměrou do 24 hodin. Při prvních 24 hodinách fermentace, tedy nedorazí ještě k vyčerpání substrátu.

Při měření pH byla odhalena tendence v prvních hodinách klesat nejrychleji. Je možné, že mléko extrahovalo z kefirových zrn kyselinu mléčnou (která zde byla přítomná před začátkem měření). Jelikož i pH má tendenci klesat oproti 24 hodinové hodnotě přímou úměrou, předpokládá se, že v prvních hodinách pracovaly nejvíce laktobacily a následně se zapojili i kvasinky, které mohly mít delší lag fázi.

Při stanovení počtu laktobacilů ve 24 hodin fermentovaném kefiru, bylo stanoveno průměrně $4,1 \cdot 10^7$ KTJ laktobacilů na 1 ml kefiru. Kefír tedy obsahuje mnoho probiotických MO. 1 tobolečka laktobacilů od firmy Dr. Max obsahuje $5 \cdot 10^9$ laktobacilů. Již 150 ml kefiru tedy převyšuje tuto dávku.

Pro budoucí měření bude vhodné zvolit UHT standardizované mléko, pro získání více stabilních výsledků.

Kefír po 24 hodinách obsahoval v průměru okolo $41 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ laktózy (pokles o $7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) a $7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ kyseliny mléčné, připravený kefir tedy ještě obsahuje relativně mnoho laktózy, což může být pro některé spotřebitele nevhodné. Důležité je však podotknout, že konzumace laktobacilů pomáhá lidem s poruchou trávení laktózy, lze tedy očekávat větší snesitelnost oproti mléku.

6 ZDROJE

- [1] GAROFALO, Cristiana, Andrea OSIMANI, Vesna MILANOVIĆ et al., 2015. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. *Food Microbiology* [online]. Elsevier Ltd, **49**, 123-133 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1016/j.fm.2015.01.017. ISSN 07400020. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0740002015000210>
- [2] GARROTE, GRACIELA L., ANALA G. ABRAHAM a GRACIELA L. DE ANTONI, 2001. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research* [online]. **68**(4), 639-652 [cit. 2016-10-16]. DOI: 10.1017/S0022029901005210. ISSN 00220299. Dostupné z: <http://search.proquest.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/docview/228109329?OpenUrlRefId=info:xri/sid:primo&accountid=17115>
- [3] BALABANOVA, Tatyana a Petar PANAYOTOV, 2011. Obtaining functional fermented beverages by using the kefir grains. *Procedia Food Science* [online]. Elsevier Ltd, **1**, 1653-1659 [cit. 2017-05-14]. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.244. ISSN 2211601X. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S2211601X11002458>
- [4] ISMAIEL, Ahmed, Mohamed GHALY a Ayman EL-NAGGAR, 2011. Milk Kefir: Ultrastructure, Antimicrobial Activity and Efficacy on Aflatoxin B1 Production by *Aspergillus flavus*. *Current Microbiology* [online]. New York: Springer-Verlag, **62**(5), 1602-1609 [cit. 2016-10-30]. DOI: 10.1007/s00284-011-9901-9. Dostupné z: <http://link.springer.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/article/10.1007/s00284-011-9901-9>
- [5] GÖRNER, Fridrich a Ľubomír VALÍK, 2004. *Aplikovaná mikrobiológia potravín: princípy mikrobiológie potravín, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 528 s.
- [6] GUL, O., M. MORTAS, I. ATALAR, M. DERVISOGLU a T. KAHYAOGU, 2015. Manufacture and characterization of kefir made from cow and buffalo milk, using kefir grain and starter culture. *Journal of Dairy Science* [online]. Elsevier Inc, **98**(3), 1517-1525 [cit. 2016-10-29]. DOI: 10.3168/jds.2014-8755. Dostupné z: [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(15\)00012-0/abstract?showall=true](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(15)00012-0/abstract?showall=true)
- [7] LAHTINEN, Sampo, 2012. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, xviii, 779 s. : il. ; 27 cm. ISBN 9781439836774.
- [8] HERTZLER, Steven a Shannon CLANCY, 2003. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association* [online]. Elsevier Inc, **103**(5), 582-587 [cit. 2016-10-30]. DOI: 10.1053/jada.2003.50111. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0002822303002074>
- [9] RANA, Satyavati, Rajesh MORYA, Aastha MALIK, Sanjay BHADADA, Naresh SACHDEVA a Gaurav SHARMA, 2016. A relationship between vitamin D, parathyroid hormone, calcium levels and lactose intolerance in type 2 diabetic patients

- and healthy subjects. *Clinica Chimica Acta* [online]. Elsevier B.V, **462**, 174-177 [cit. 2016-10-23]. DOI: 10.1016/j.cca.2016.09.009. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0009898116303825>
- [10] Breath Test Analyzer for Hydrogen & Methane Monitoring, 1996-2017. In: *Indiamart* [online]. India: IndiaMART InterMESH [cit. 2017-05-04]. Dostupné z: <https://www.indiamart.com/wbm-health-science/medical-instruments.html#breath-test-analyzer-for-hydrogen-methane-monitoring>
- [11] MACUAMULE, C.L.S., I.J. WIID, P.D. VAN HELDEN, M. TANNER a R.C. WITTHUHN, 2016. Effect of milk fermentation by kefir grains and selected single strains of lactic acid bacteria on the survival of Mycobacterium bovis BCG. *International Journal of Food Microbiology* [online]. Elsevier B.V, **217**, 170-176 [cit. 2016-10-29]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.024. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160515301562>
- [12] RAKICKÁ, Milada, Andrea MARKO, Ernest ŠTURDÍK, Martina DANIHELOVÁ, Silvia MOŠOVSKÁ a Lucia JURÍKOVÁ, 2015. VPLYV FERMENTÁCIE BAKTÉRIAMI MLIEČNEHO KYSNUTIA NA CHEMICKÚ KOMPOZÍCIU POTRAVIN. *Chem. Listy* [online]. (109), 371–376 [cit. 2017-05-11]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2015_05_371-376.pdf
- [13] CAPLICE, Elizabeth a Gerald FITZGERALD, 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* [online]. Elsevier B.V, **50**(1), 131-149 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1016/S0168-1605(99)00082-3. ISSN 01681605.
- [14] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ, 2009. *Chemie potravin* 2. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 304 s.
- [15] NIKOLOVA, Irina, b.r. *Chromatografické metody* [online]. 1. [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: http://physics.ujep.cz/~mkormund/P219/chromatograficke_metody_2014.pdf
- [16] HARRIS, Daniel, 1997. *Exploring chemical analysis*. 1st ed. New York: W.H. Freeman and Company, 476 s.
- [17] GÜNZLER, Helmut, ed. a Alex WILLIAMS, ed., 2001. *Handbook of analytical techniques*. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH.
- [18] GÓMEZ-ÁLVAREZ, E., E. LUQUE-PÉREZ, A. RÍOS a M. VALCÁRCEL, 1999. Flow injection spectrophotometric determination of lactic acid in skimmed milk based on a photochemical reaction. *Talanta* [online]. Elsevier B.V, **50**(1), 121-131 [cit. 2016-11-13]. DOI: 10.1016/S0039-9140(99)00112-5. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0039914099001125>
- [19] CVAČKA, Josef, 2010. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie: Detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii. In: *Univerzita Karlova: Přírodovědecká fakulta* [online]. Praha: Univerzita Karlova v Praze [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc3.pdf>
- [20] VESELÁ, Mária, 2004. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 3. vyd. Brno: VUT FCH, 99 s. ISBN 8021425679.

7 SEZNAM ZKRATEK

BMK	bakterie mléčného kvašení
HPLC	vysokoúčinnou kapalinovou chromatografi (High-performance liquid chromatography)

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

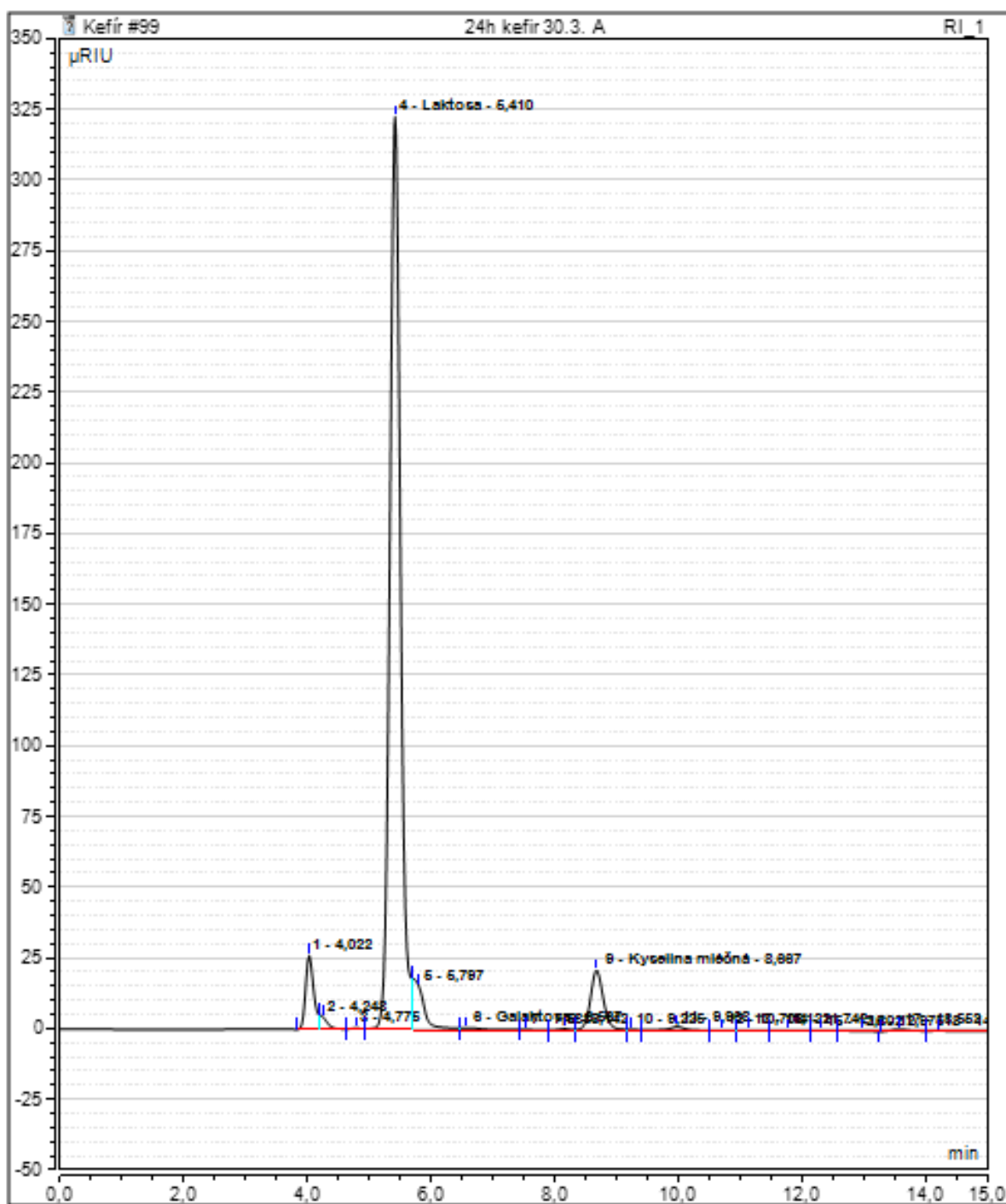
Obrázek 1: Keřřov�� zrno [3]	8
Obrázek 2: snímků povrchu keřřov��ch zrn z Itálie ze 6 různých regionů [1]	9
Obrázek 3: Ru��n�� dechov�� tester pro monitorování vodíku [10]	10
Obrázek 4: Zjednoduř��n�� schéma homofermentativní a heterofermentativn�� dráhy [13]	12
Obrázek 5: 2��hydroxypropanov�� kyselina (k. ml����n��).....	13
Obrázek 6:Zjednoduř��n�� schéma kapalinov�� chromatografie [15]	14
Obrázek 7: Lambert-Beerův zákon	15
Obrázek 8: Schéma desítkového ř��d��n�� [20]	16
Obrázek 9: Keřřov�� zrna pou��žit�� pro m��řen�� (40 g, maxim��ln�� 0,5 cm průměr zrn)	17
Obrázek 10: Změny pH v průběhu fermentace	20
Obrázek 11: $\Delta pH/\Delta t$ v závislosti čase	21
Obrázek 12: Změny pH v průběhu fermentace	22
Obrázek 13: Tvorba kyseliny ml����n�� v průběhu fermentace	23
Obrázek 14: Množství laktózy v průběhu fermentace	23
Obrázek 15: Kultivace laktobacilů na MRS médiu	25
Obrázek 16: Chromatogram mléko RI	31
Obrázek 17: Chromatogram keřřu RI	32
Obrázek 18: Chromatogram mléko UV-VIS	33
Obrázek 19: Chromatogram keřřu UV-VIS	34

9 SEZNAM TABULEK

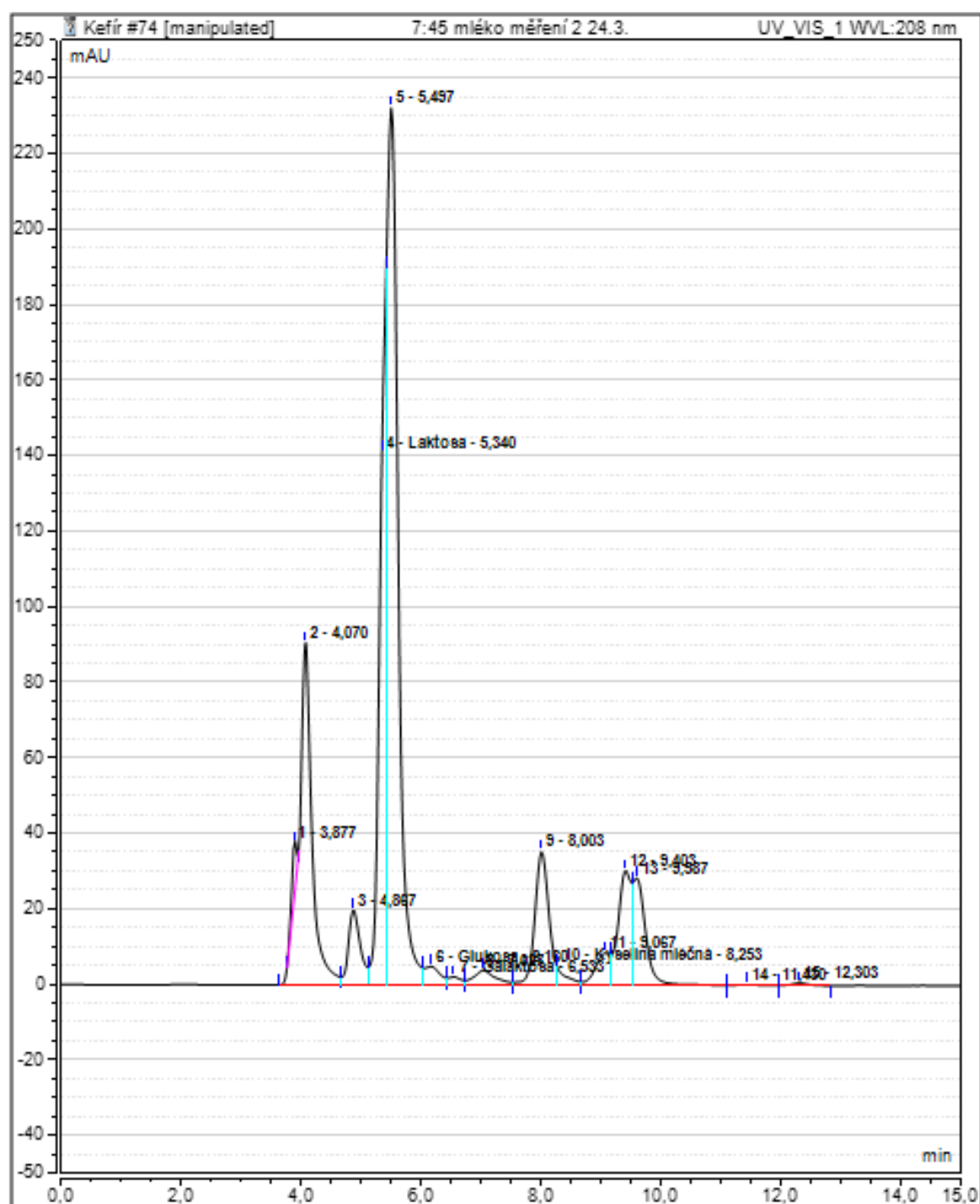
Tabulka 1: HPLC parametry	18
Tabulka 2: Kultivace laktobacilů na MRS médiu	24
Tabulka 3: Nam��řen�� data 24 h kultivovaného keřřu	24
Tabulka 4: Srovnání aerobních a anaerobních podmínek	25

Obrázek 16: Chromatogram mléko RI

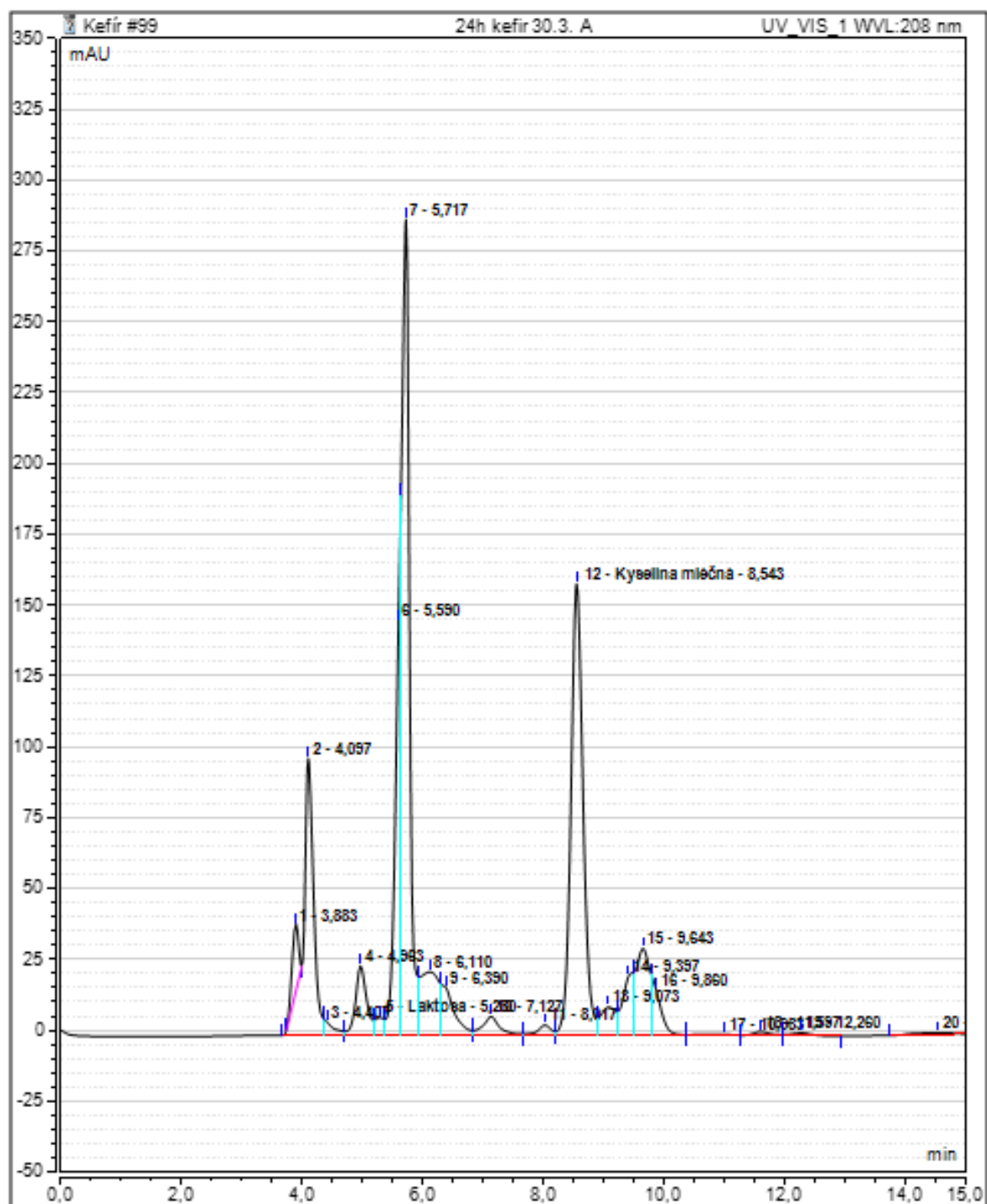




Obrázek 17: Chromatogram kefiru RI



Obrázek 18: Chromatogram mléko UV-VIS



Obrázek 19: Chromatogram kefiru UV-VIS